

На правах рукописи

ГАБСАБИРОВА РЕГИНА РАСИМОВНА

**АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ПЕРОКСИДАЗНЫЕ СЕНСОРЫ НА  
ОСНОВЕ ГРАФИТОВЫХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ  
ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

03.00.16 –Экология

**А в т о р е ф е р а т**  
диссертации на соискание учёной  
степени кандидата химических наук

КАЗАНЬ –2003

Работа выполнена на кафедре прикладной экологии Казанского  
государственного университета им. В. И. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: доктор химических наук,  
доцент Евтюгин Геннадий Артурович

Официальные оппоненты: доктор химических наук,  
профессор Фридланд Сергей Владимирович  
кандидат биологических наук,  
ст.научн.сотр. Петров Андрей Михайлович

Ведущая организация Научно-исследовательский институт  
безопасности жизнедеятельности  
Республики Башкортостан (г.Уфа)

Защита диссертации состоится 23 декабря 2003 г. в 14<sup>30</sup> на заседании диссертационного Совета Д 212.081.19 при Казанском государственном университете им. В. И. Ульянова-Ленина, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, ауд. 204 экологического факультета.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета.

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 420008, г.Казань, ул.Кремлевская, 18, КГУ, Научная часть

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,  
доктор химических наук

Г.А. Евтюгин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Современное развитие экологического мониторинга отличается повышенным вниманием, уделяемым развитию средств экспресс-оценки состояния окружающей среды на основании токсикологических критериев. Целью применения таких нестандартных средств диагностики является совокупная оценка неблагоприятных последствий всей совокупности токсикантов, присутствующих в объекте контроля, на биоту. Такая оценка должна предшествовать полному анализу физико-химических и токсикологических свойств образца, требующему дорогостоящего лабораторного оборудования (хроматомасс-спектрометрия, ВЭЖХ и др.) и высокой квалификации обслуживающего персонала. Экспресс-системы оповещения о токсичности призваны заполнить существующий разрыв между потребностью населения и контролирующими природоохранными органами в достоверной информации о качестве среды обитания и реальными сроками ее получения.

Ферменты как никакие другие биологические компоненты подходят для создания и использования экспрессных биологических тестов в экоаналитическом контроле окружающей среды. Они обеспечивают получение быстрого и чувствительного сигнала и способны в течение нескольких минут определить присутствие той или иной группы токсических веществ в объекте контроля. Немаловажно, что влияние токсикантов на ферменты поддается количественной обработке и может быть осуществлено с использованием стандартных процедур, достаточно распространенных в биотехнологии, клиническом анализе и микробиологической промышленности. Это расширяет сферу применения экологического мониторинга и позволяет одновременно решать задачи экотоксикологии и экологического нормирования поступающих загрязняющих веществ.

Вместе с тем, практическое использование биохимической диагностики требует предварительного решения задач стандартизации отклика на основные экотоксиканты. Эта проблема особенно актуальна, если объект отличается разнообразием макро- и микрокомпонентов, что типично для промышленных сточных вод и отходов производства и потребления. Требуется надежная теоретическая и экспериментальная база для производства и эксплуатации ферментных тестов, в том числе с использованием серийно выпускаемого измерительного оборудования.

Пероксидаза - один из наиболее изученных ферментов, широко используемых в биоаналитических методах исследования. Помимо широкой субстратной

специфичности, пероксидаза является индикатором уровня метаболических процессов и стрессовых состояний живых организмов. Это делает пероксидазу одним из перспективных объектов для включения в состав ферментных сенсорных устройств, предназначенных для оценки загрязнения окружающей среды. В этой связи настоящая работа, эколого-аналитическому применению пероксидазного сенсора, является **актуальной**.

**Целью настоящей работы** явилось создание и всесторонняя характеристика пероксидазного сенсора на основе планарного графитового электрода, предназначенного для контроля содержания основных токсикантов и обобщенной оценки загрязнения сточных вод.

Для достижения поставленной цели были поставлены и решены следующие задачи:

- определены оптимальные условия иммобилизации пероксидазы и измерения сигнала сенсора в присутствии различных токсикантов и сточных вод;
- оценена чувствительность сигнала пероксидазного сенсора к модельным токсикантам в однокомпонентных растворах;
- установлены факторы, влияющие на проявление токсических свойств субстратов и эффекторов пероксидазы, а также вклад неферментативных путей образования конечных продуктов;
- проведен скрининг пероксидазной активности ранее не изучавшихся соединений с различными функциональными группами (циклические производные пиридоксина) для установления влияния их строения пероксидазную активность;
- проведено тестирование сточных вод предприятий г.Казани и установлена зависимость между сигналом пероксидазного сенсора при различных разведениях вод, гидрохимическими и токсикологическими характеристиками стоков с привлечением современных методов статистического анализа.

**Научная новизна** работы заключается в том, что:

- впервые предложено использовать пероксидазный сенсор для количественной характеристики замещенных фенолов и анилинов - потенциальных компонентов сточных вод;
- впервые установлено влияние процессов каталитического окисления гидрохинона в присутствии ионов металлов на изменение сигнала пероксидазного сенсора в широком диапазоне pH и концентраций реагентов;

- определены рабочие условия измерения сигнала, позволяющие разделить влияние отдельных групп токсикантов и неферментативные (каталитические) стадии образования продуктов на сигнал биосенсора;
- впервые охарактеризованы свойства циклических замещенных пиридоксинов как эффекторов пероксидазы;
- показана возможность использования показателя пероксидазной активности для классификации сточных вод по степени их очистки и источнику поступления, установлена корреляция сигнала биосенсора с результатами биотестирования на *Paramecium caudatum* (острая токсичность).

**Практическая значимость** работы состоит в том, что:

- разработаны простые и удобные способы иммобилизации пероксидазы и регистрации пероксидазной активности по току восстановления бензохинона, образующегося в реакции с участием гидрохинона на поверхности амперометрического сенсора;
- предложены методики определения замещенных фенолов и анилинов - субстратов пероксидазы, а также оценки загрязненности промышленных сточных вод без трудоемких способов пробоподготовки;
- на примере циклических производных пиридоксина предложены подходы к оценке влияния структуры соединений на их пероксидазную активность, предложены упрощенные процедуры предварительного скрининга биохимической активности новых синтезированных органических соединений, содержащих несколько потенциальных центров связывания с ферментом.

Часть экспериментальных результатов и выводы на их основе использованы в учебном процессе в Казанском государственного университете при чтении общего курса "Экологических мониторинг".

**На защиту выносятся:**

- исследование влияния условий иммобилизации и измерения сигнала на чувствительность определения органических субстратов и неорганических ингибиторов пероксидаз и вывод о характере влияния упомянутых факторов на сигнал пероксидазного сенсора;
- обоснование возможности применения пероксидазного сенсора в предварительной оценке уровня и характера загрязнения муниципальных и промышленных сточных вод;
- сравнительное изучение процессов каталитического и ферментативного окисления гидрохинона пероксидом водорода в присутствии ионов металлов и вы-

вод о вкладе неферментативных реакций в сигнал пероксидазного сенсора в присутствии солей никеля, кадмия, свинца и ртути (II);

- классификация сточных вод по показателям пероксидазной активности и вывод о возможности определения источника и степени загрязненности сточных вод по совокупности гидрохимических, экотоксикологических и биосенсорных данных;
- скрининг пероксидазной активности циклических производных пиридоксина и подходы к определению центров связывания и механизма действия полифункциональных неспецифических ингибиторов фермента.

**Апробация работы.** Основные результаты работы докладывались на Итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (2001, 2002 гг.), Всероссийском симпозиуме "Тест-методы химического анализа" (2001 г.), Поволжской конференции по аналитической химии (2001 г.), Всероссийской конференции с международным участием "Актуальные проблемы аналитической химии" (2002 г.), Международной конференции по аналитической химии Euroanalysis-12 (Дортмунд, Германия, 2002 г.), III Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2003 г.).

**Основные результаты** изложены в 1 статье и 6 тезисах докладов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 141 странице машинописного текста, включает 40 рисунков и 26 таблиц. Состоит из введения, шести глав, выводов и списка использованных библиографических источников, включающего 163 ссылки на отечественные и зарубежные работы.

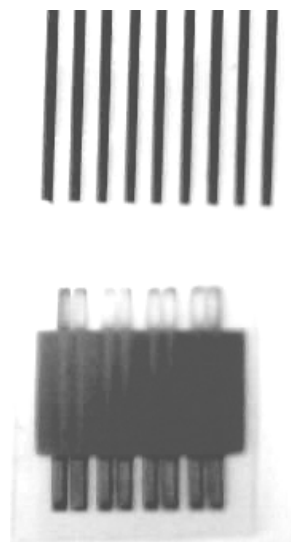
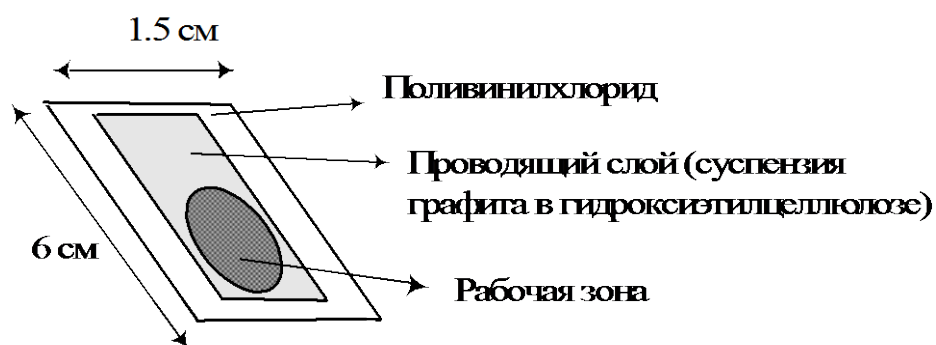
Диссертация выполнена на кафедре прикладной экологии Казанского государственного университета в рамках госбюджетной темы ГР № 01.98.0006937, код ГСНТИ 87.43.21, при поддержке грантов РФФИ (00-03-32605 "Разработка электрохимических биосенсоров на основе планарных модифицированных электродов для диагностики загрязнения окружающей среды"), CRDF (НОЦ Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века" REC-007), Академии наук Татарстана (09-9.4-124/2003(Ф) "Информационно-аналитическая система оценки токсичности промышленных сточных вод на основе биосенсоров").

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Экспериментальная часть

Использовали пероксидазу из корней хрена производства Vitact, Россия, с удельной активностью 3 IE / мг. Субстратами ферментативной реакции служили гидрохинон и перекись водорода. Имобилизацию проводили кросс-сшивкой глутаровым альдегидом из расчета 1 E на электрод в присутствии 0.5% нафiona и 0.01% желатина.

Для изготовления пероксидазных сенсоров использовали планарные электроды на основе пленок поливинилхлорида со слоем графитовой композиции, наносимых методом трафаретной печати (НПВП "ИВА", Екатеринбург) или путем напыления (университет г. Перпиньян, Франция).



В качестве модельных токсикантов - субстратов и эффекторов пероксидазы - исследовали соли меди (II), ртути (II), свинца, никеля и кадмия, замещенные ароматические амины и фенолы, гидроксилламин, гидразин сульфат, триэтанолламин, алифатические спирты. Были изучены производные пиридоксина (табл.1), синтезированные под рук. с.н.с. Штырлина Ю.Г. в Научно-исследовательском химическом институте им.А.М.Бутлерова.

Сигнал пероксидазных сенсоров регистрировали с помощью полярографического анализатора РА-2 (Брно, Чехия) и вольтамперометрического анализатора ИВА-5 (НПВП "ИВА", Екатеринбург) в режиме линейной развертки потенциала или при постоянном потенциале. Все потенциалы измеряли относительно хлорсеребряного электрода сравнения (Ag/AgCl). Противоелектродом служила никелевая фольга. Измерения проводили в 0.002 М ацетатном или фосфатном буферном растворе.

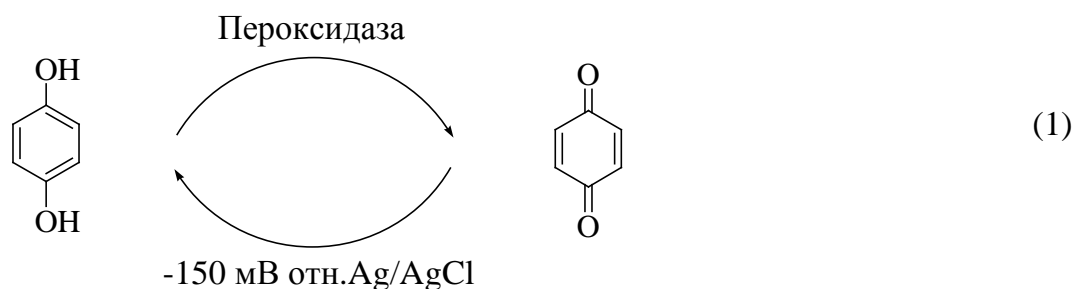
Таблица 1

Структура и шифры производных пиридоксина, изученных в работе

Шифр	Структура	Шифр	Структура
1		7	
2		8	
3		9	
4		10	
5		11	
6			



Сигналом пероксидазного сенсора служил ток восстановления бензохинона, образующегося в реакции пероксидазного окисления гидрохинона (1).



Измерение активирующего и ингибирующего действия эффекторов проводили, добавляя их к рабочему буферному раствору на 10 мин., после чего в тот же раствор вносили гидрохинон и пероксид водорода (по 1.0 мМ) и измеряли сигнал. Аналогичным образом проводили тестирование сточных вод. Перед измерением воды фильтровали, корректировали pH до величины 6.5 и разбавляли в пропорции от 1:1 до 1:100.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Операционные характеристики пероксидазного сенсора.** Для оценки активности иммобилизованной пероксидазы нами предложено использовать реакцию окисления гидрохинона. Преимуществами данного субстрата являются обратимость ферментативного и электрохимического превращения, а также отсутствие продуктов поликонденсации и неспецифической сорбции субстрата и продукта на графитовых электродах. В отсутствие пероксидазы окисление гидрохинона пероксидом водорода протекает достаточно медленно и оказывает влияние на сигнал биосенсора только при больших избытках окислителя относительно гидрохинона или в присутствии ионов металлов, катализирующих неферментативное окисление субстрата.

На рис.1 в качестве примера представлена поверхность отклика, полученная путем моделирования по индивидуальным концентрационным профилям с помощью ППП Surfer. В слабокислой среде чувствительность сигнала к гидрохинону намного выше, чем к пероксиду водорода. В области высоких концентраций последнего проявляется спад сигнала, связанный с побочными окислительными реакциями с участием данного субстрата. Напротив, в нейтральной среде наклон начального линейного участка выше при варьировании концентрации пероксида водорода. Расчетные значения константы Михаэлиса по значениям тока, отвечающего насыщающим концентрациям субстратов, дали значение

0.4±0.1 мМ, хорошо согласующееся с литературными данными, а также результатами кинетических исследований с нативным ферментом. Это свидетельствует об отсутствии значительного диффузионного торможения переноса субстрата к активному центру, а также о том, что процедура иммобилизации не затрагивает ближайшего окружения активного центра фермента.

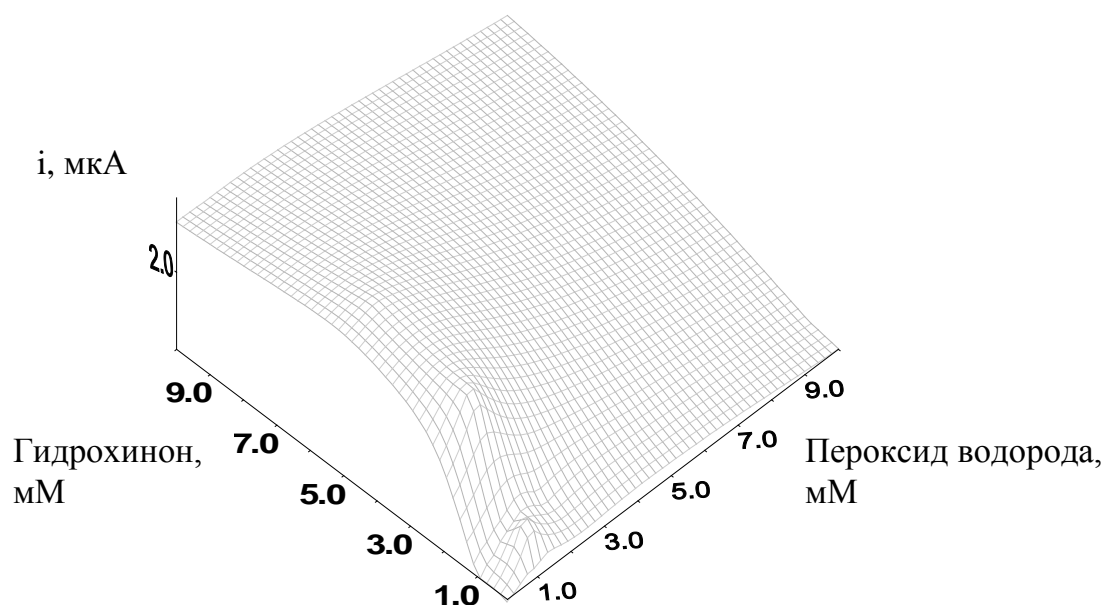


Рисунок 1. Поверхность отклика пероксидазного сенсора. Фосфатный буферный раствор, pH 4.5

Нагрузку фермента определяли исходя из величины сигнала (рис.2) и его стабильности.

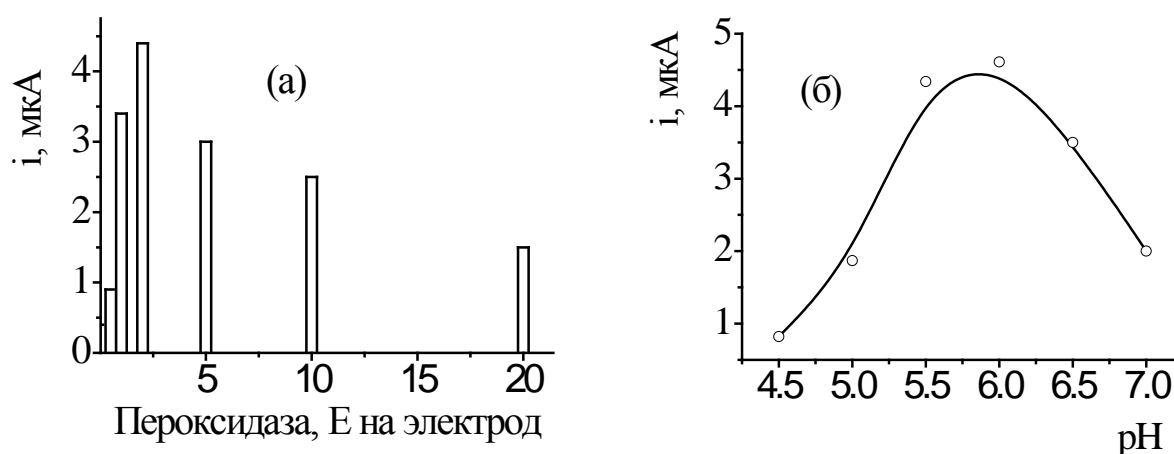


Рисунок 2. Зависимость сигнала от концентрации фермента (а) и pH (б)

Максимум активности пероксидазы при ее иммобилизации смещается в сторону бóльших значений pH. Это может быть проявлением собственных буферных свойств белковой пленки на электроде или связано с участием ионов водорода в реакции катодного восстановления бензохинона.

Для шести последовательных измерений на одном электроде погрешность определения сигнала пероксидазного сенсора составила 4%, в серии из шести электродов, приготовленных одновременно, - 7-8%. Отклик стабилен при хранении и использовании сенсора в течение по крайней мере месяца. В этот период времени происходит закономерное увеличение времени отклика и погрешности его измерения, сопровождаемое помутнением и растрескиванием поверхностной белковой пленки.

Характеристики определения других потенциальных субстратов пероксидазы в сравнении с гидрохиноном приведены в табл.2.

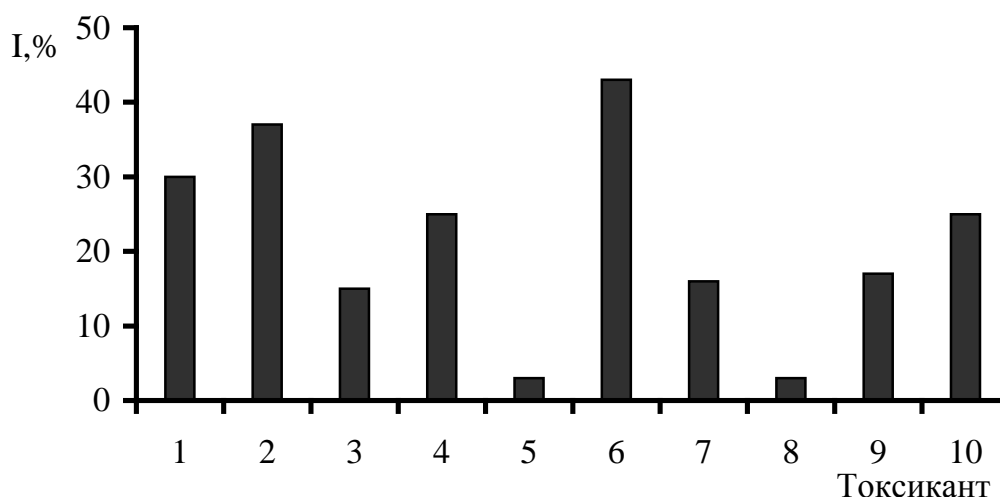
Таблица 2

Характеристики определения субстратов пероксидазы с помощью амперометрического биосенсора

Субстрат пероксидазы	Предел обнаружения, мМ	Диапазон определяемых концентраций, мМ	Чувствительность, А М <sup>-1</sup> см <sup>-2</sup>
Гидрохинон	0.01	0.02-0.08	0.18
<i>n</i> -Метоксианилин	0.02	0.03-1.00	0.031
<i>n</i> -Хлоранилин	0.005	0.006-0.060	0.035
<i>m</i> -Толуидин	0.02	0.03-0.45	0.10
3,4-Дихлорфенол	0.09	0.12-0.22	0.125
2-Амино-4-нитрофенол	0.003	0.005-0.230	0.27

По чувствительности и диапазону определяемых концентраций с гидрохиноном может соперничать только 2-амино-4-нитрофенол. Но он склонен к полимеризации в условиях измерения сигнала, что приводит к неконтролируемым изменениям сигнала в серии измерений с одним и тем же электродом.

**Влияние эффекторов пероксидаз - модельных токсикантов.** Вещества, меняющие активность фермента или его состояние в белковой пленке, закономерно изменяют сигнал пероксидазного сенсора. Результаты скрининга пероксидазной активности ряда типичных представителей сточных вод химических производств приведены на рис.3.



*Рисунок 3.* Относительное изменение сигнала (I,%) пероксидазного сенсора в присутствии 1 мг/л токсикантов. 1 - триэтаноламин, 2 - гидразин сульфат, 3 - изобутиловый спирт, 4 - оксалат натрия, 5 - анилин, 6 - нитрат кадмия, 7 - хлорид меди (II), 8 - гидроксилламин гидрохлорид, 9 - муравьиная кислота, 10 - нитрат свинца. Гидрохинон и пероксид водорода 1.0 мМ. Фосфатный буферный раствор, рН 6.0.

Действие всей указанных соединений носит обратимых характер, только изобутанол после отмывки биосенсора сохраняет свое ингибирующее действие, что, возможно, обусловлено необратимыми изменениями третичной структуры белка вследствие нарушения гидрофильно-гидрофобного баланса. Сходный эффект оказывают и другие органические растворители, смешивающиеся с водой.

Действие ионов металлов ограничено влиянием фосфатного буферного раствора, снижающего их подвижность в белковом слое. В ацетатном буферном растворе в нейтральной и слабокислой среде действие металлов на сигнал пероксидазного сенсора становится неоднозначным. Впервые обнаружено, что варьирование концентрации токсикантов вместо закономерного изменения ингибирующего действия приводит к появлению острых максимумов активности. Их положение и величина зависят от природы металла и условий эксперимента. В качестве примера на рис. 4 представлено относительное изменение сигнала при варьировании концентрации ионов ртути (II) и рН.

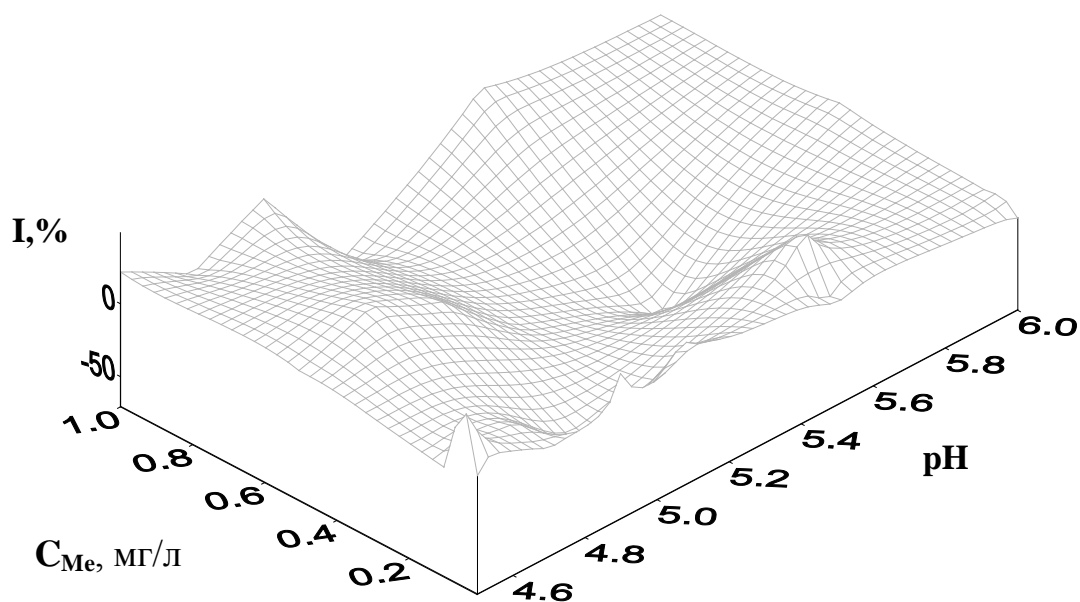


Рисунок 4. Влияние ионов ртути (II) на относительное изменение сигнала (I, %) пероксидазного сенсора. Гидрохинон и пероксид водорода 1.0 мМ, ацетатный буферный раствор, рН 5.5. Инкубирование 10 мин.

Для всех изученных металлов (Hg(II), Cd, Cu(II), Pb, Ni) при общем сохранении тенденции к увеличению ингибирующего действия по мере возрастания их концентрации в области средних концентраций и рН наблюдается "яма" - область активации фермента. Кроме того, встречаются локальные максимумы и минимумы активности на краях поверхности сигнала, что может быть обусловлено гидролитической неустойчивостью ионов металлов и недостаточной эффективностью процедуры сглаживания.

Для объяснения активирующего действия металлов на сигнал пероксидазного сенсора было выдвинуто предположение об участии ионов металлов в неферментативном окислении гидрохинона. Действительно, как показали эксперименты, в присутствии ионов металлов окисление гидрохинона пероксидом водорода значительно ускоряется, что приводит к образованию дополнительных количеств бензохинона и увеличению сигнала биосенсора. В качестве примера на рис.5 представлены зависимости тока восстановления бензохинона от продолжительности реакции в смеси гидрохинона, нитрата кадмия и пероксида водорода, зарегистрированные на стеклографитовом электроде в отсутствие пероксидазы. Как видно, заметное накопление бензохинона происходит уже к 15 минуте. Максимальные значения сигнала соответствуют окислению около 20% исходного количества субстрата. Очевидно, что при тестировании проб произвольного состава (сточных вод и др.) совокупный эффект всех металлов, присут-

ствующих в образце, может значительно превышать указанное значение. Поскольку катодное восстановление регенерирует субстрат, неферментативное образование бензохинона может увеличивать сигнал биосенсора многократно.

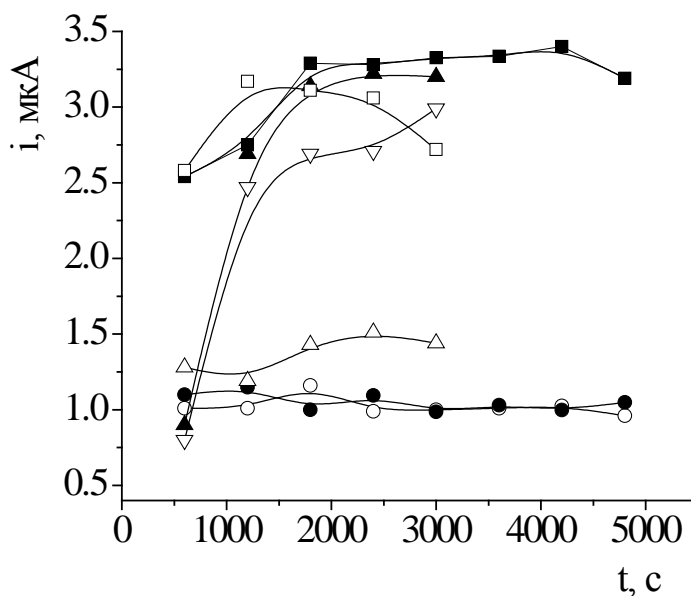


Рисунок 5. Зависимость тока восстановления бензохинона от состава реакционной смеси в присутствии ионов кадмия. 7 -  $C_{Cd}$  0.09 мМ,  $C_{H_2O_2}$  5.0 мМ, 8 -  $C_{Cd}$  0.09 мМ,  $C_{H_2O_2}$  0.5 мМ, ! -  $C_{Cd}$  0.022 мМ,  $C_{H_2O_2}$  1.0 мМ, ▽ -  $C_{Cd}$  0.09 мМ,  $C_{H_2O_2}$  2.0 мМ, , -  $C_{Cd}$  0.044 мМ,  $C_{H_2O_2}$  1.0 мМ, — -  $C_{Cd}$  4.3 мкМ,  $C_{H_2O_2}$  1.0 мМ. Концентрация гидрохинона 1.0 мМ, ацетатный буферный раствор, pH 5.0.

В изученных условиях каталитическая активность металлов увеличивается в ряду: медь < кадмий < свинец. Каталитическое действие солей ртути охарактеризовать не удалось в силу низкой воспроизводимости ее влияния. Возможно, это связано с гидролитической неустойчивостью ионов ртути (II) в изученном диапазоне pH.

**Тестирование промышленных сточных вод.** Было проведено тестирование 58 проб сточных вод, отобранных в рамках программы контроля промышленных стоков ЦСИАК Минэкологии и природных ресурсов Татарстана. Статистика основных гидрохимических показателей показала нормальное распределение всех характеристик (табл.3). При оценке пероксидазной активности воды разбавляли в интервале от 1:1 до 1:500. Всего более 60% всех проб показало активацию или ингибирование сигнала биосенсора. В тестах на острую токсичность на парameциях было выявлено 4 токсичных образца, на дафниях - 16.

Разбавление стоков нерегулярно влияет на сигнал пероксидазного сенсора. Как и в случае с ионами металлов, на зависимостях сигнала от разбавления имеются максимумы и минимумы, характерные для отдельных источников поступления стоков. Можно предположить, что такое поведение определяется соотношением содержания органического вещества и металлов.

Таблица 3

Статистическая оценка некоторых гидрохимических показателей выборки проб промышленных и хозяйственно-бытовых сточных вод г.Казани

Параметр	рН	Взвешенные <sup>*)</sup>	ХПК <sup>*)</sup>	БПК <sub>5</sub> <sup>*)</sup>	Нефте-продукты <sup>*)</sup>	АПАВ <sup>*)</sup>
Число проб	46	55	55	55	27	31
Среднее	7.54	4.62	4.83	3.59	-1.11	-1.33
Расхождение	0.18	1.24	1.44	2.98	2.64	2.01
Стандартная погрешность	0.42	1.11	1.20	1.73	1.62	1.42
Минимальное значение	6.7	2.94	2.91	0.41	-3.91	-4.02
Максимальное значение	8.4	6.61	6.70	5.87	1.19	0.64
Разбег	1.7	3.66	3.79	5.47	5.11	4.66
Стандартная асимметрия	0.090	0.48	-0.13	-1.39	-0.59	-0.85
Стандартный эксцесс	-0.89	-1.36	-1.88	-1.54	-0.95	-1.17

\*) Логарифмическая шкала, lg(C, мг/л)

При высоком содержании органического вещества разбавление сточных вод уменьшает ингибирующее действие металлов. Если же содержание органического вещества невелико, то превалирует каталитическое действие металлов и связанное с ним неферментативное образование бензохинона. На изменение сигнала будут влиять также комплексообразование и гидролиз солей металлов. Все это делает пероксидазный сенсор неспецифичным индикатором характера загрязнения сточных вод, а разбавление позволяет получить дополнительную информацию о характере загрязнения.

Статистика биосенсорных данных (относительное изменение сигнала пероксидазного сенсора при различных разбавлениях вод) выявила выпадения, искажающие их нормальное распределение. Учитывая небольшой объем выборки, было предложено модифицировать данные с помощью виндзорских преобра-

зований. Суть их состоит в замене выпадающих значений следующими по рангу, полученными после сортировки всей исходной выборки. Это привело к значительному улучшению исходной статистики и последующей классификации сточных вод с использованием таких данных.

Для оценки прогнозных возможностей пероксидазного сенсора с помощью дискриминантного анализа была проведена классификация исходной выборки данных по трем моделям, учитывающим характер формирования стоков, их первичную очистку и сезон. Результаты классификации представлены в табл.4-6.

Таблица 4

Классификация сточных вод по источнику: хозяйственно бытовые сточные воды (класс 1) и промышленные сточные воды (класс 2)

Реальный класс образца	Размер группы	Предсказанный класс	
		1	2
1	38	<b>21 (55%)</b>	17 (45%)
2	14	2 (14%)	<b>12 (85%)</b>

Таблица 5

Классификация сточных вод по обработке: сточные воды, поступающие на очистные сооружения (класс 1) и очищенные перед сбросом в коллектор (класс 2).

Реальный класс образца	Размер группы	Предсказанный класс	
		1	2
1	27	<b>21 (78%)</b>	17 (45%)
2	26	10 (38%)	<b>16 (62%)</b>

Таблица 6

Классификация сточных вод по сезону: осень (класс 1), зима (класс 2), весна (класс 3)

Реальный класс образца	Размер группы	Предсказанный класс		
		1	2	3
1	18	<b>10 (56%)</b>	3 (17%)	5 (27%)
2	18	9 (50%)	<b>7 (39%)</b>	2 (11%)
3	20	5 (25%)	6 (30%)	<b>9 (45%)</b>

Как видно, биосенсорные данные по пяти разбавлениям сточных вод (от 1:1 до 1:500) позволяют добиться успешного прогноза в 80% случаев по первой модели (источник сточных вод) и около 70% - по второй (очистка). Для сравне-



ния, аналогичные прогнозы по совокупности гидрохимических показателей показали успешность не более 55%, что близко к априорной вероятности класса.

Сезонные изменения состава сточных вод, очевидно, незначительны для достоверного их установления, поэтому все варианты расчетов не дали достоверного прогноза класса. Аналогичным образом, установлена корреляция сигнала пероксидазного сенсора и показателя острой токсичности для парамеций (более 80%) и дафний (около 70%). Однако малое количество токсичных проб не позволило дать полную количественную оценку связи.

**Оценка пероксидазной активности циклических производных пиридоксина.** Возможность быстрой оценки биологического эффекта новых синтезированных соединений была показана на примере семичленных циклических ацеталей и кеталей пиридоксина (витамина В<sub>6</sub>). Пероксидазная активность указанных соединений **1-11** предположительно связана с наличием гидроксильной группы пиридоксинового кольца, потенциально способного к окислительным превращениям аналогично замещенным фенолам. Действительно, соединения **2** и **8** показывают выраженный активирующий эффект на иммобилизованную пероксидазу, увеличивая сигнал биосенсора в 1.5-2.5 раза. Они характеризуются максимальной чувствительностью и минимальным значением действующих концентраций в представленном ряду. Вместе с тем, соединения **9-11** практически не действуют на фермент (табл.7).

Таблица 7

Влияние циклических производных пиридоксина на активность пероксидазы

Шифр соединения	Чувствительность (Δ%/Δ lgC)	Концентрация максимального эффекта	Диапазон изученных концентраций, нМ
<b>1</b>	40	4-6 мкМ	10 - 800
<b>2</b>	60	10 нМ	0.5 - 100
<b>3</b>	34	2 мкМ	1 - 2000
<b>4</b>	-20	40 нМ	1 - 40
<b>8</b>	55	100 нМ	1 - 600

Обращает внимание, что при переходе от ацетали **2** к кетали **8** эффективность активации снижается практически в 10 раз, хотя семичленный цикл находится достаточно далеко от потенциального центра связывания. По-видимому, различия в пероксидазной активности указанных соединений определяются также доступностью гидроксильной группы для редокс-центра фермента. Конфор-

мационные изменения в цикле (при переходе от ацетали к кетали и от метильного к изопропильному заместителю) и наличие разветвленного 2-диметиламиноэтильного заместителя в пиридоксиновом фрагменте затрудняют достижение необходимой ориентации эффектора относительно активного центра фермента, что снижает его влияние на фермент. Что касается соединений **1**, **3** и **4**, их активирующее действие связано, по-видимому, с первичных гидролизом сложноэфирной группы и высвобождением свободной гидроксогруппы (превращением в соединения **2** и **8**). В пользу этого свидетельствует отсутствие пероксидазной активности у простого эфира **7**, не способного к гидролизу.

Поскольку скорость гидролиза зависит от природы уходящей группы и pH раствора, активирующее действие указанных соединений выражено намного слабее. В случае соединения **4** в изученном диапазоне концентраций превалирует незначительное ингибирующее действие, возможно, в силу прямого ингибирующего действия бензоат-иона на геминовый центр пероксидазы. Что касается аминокпроизводных **9** и **10**, их биологическая активность может иметь иной характер, в частности, благодаря способности аминокгрупп к конкурентному связыванию с гидролитическими ферментами. Холинэргическое действие данных соединений было подтверждено в экспериментах с нативной холинэстеразой.

Таким образом, разработанный биосенсор позволил провести оценку влияния конформационных эффектов на специфичность связывания и уровень пероксидазной активности циклических производных пиридоксина.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан пероксидазный сенсор на основе пероксидазы из хрена, иммобилизованной на поверхности графитового планарного электрода путем кросс-сшивки глутаровым альдегидом в присутствии стабилизирующих добавок желатина. Для мониторинга пероксидазной активности использован гидрохинон, дающий стабильный сигнал, отнесенный к восстановлению окисленной формы (бензохинона), образующейся в ферментативной реакции в присутствии пероксида водорода.
2. Пероксидазный сенсор позволяет обнаруживать широкий круг потенциальных загрязнителей (производные фенола и анилина, тяжелые металлы, ряд азоторганических соединений и органических растворителей) как субстратов и ингибиторов фермента в милли- и микромолярном диапазоне их содержания, что поз-

воляет использовать биосенсор для предварительной оценки уровня и характера загрязнения муниципальных и промышленных сточных вод.

3. Исследование реакций гидрохинона в условиях измерения сигнала выявило вклад неферментативных реакций в образование бензохинона в присутствии солей никеля, кадмия, свинца и ртути (II), что расширило диапазон изменения сигнала пероксидазного сенсора при тестировании сточных вод, содержащих значительные количества окисляющихся органических веществ и солей металлов.

4. Совместное использование гидрохимических и биосенсорных данных позволило провести классификацию сточных вод по их источнику и степени очистки с успешностью прогноза до 80%. Установлена корреляция показателя пероксидазной активности исследованных муниципальных и хозяйственно-бытовых стоков с их острой токсичностью для *Daphnia magna* и *Paramecium caudatum*.

5. На основе изучения пероксидазной активности семичленных циклических ацеталей и кеталей - производных пиридоксина - установлено влияние стерических и конформационных факторов в их биологическую активность и возможность определения указанных соединений по их активирующему действию на фермент в наномолярном диапазоне концентраций.

### **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Будников Г.К. Обобщенная оценка загрязнения сточных вод на основе пероксидазных и холинэстеразных одноразовых сенсоров / Г.К.Будников, Е.В.Супрун, Р.Р.Габсабиров, Г.А.Евтюгин, Ж.-Л.Марти, В.Г.Винтер // Всерос. симпозиум "Тест-методы химического анализа". Москва 28-30 ноября 2001 г. С64
2. Габсабиров Р.Р. Экспресс-оценка органического загрязнения с помощью пероксидазного сенсора / Р.Р.Габсабиров, Е.В.Супрун, Г.А.Евтюгин, Г.К.Будников // Поволжская конференция по аналитической химии. Казань, 20-22 ноября 2001 г. С.58.
3. Супрун Е.В. Оценка загрязнения сточных вод с помощью комбинированных ферментных сенсоров на основе печатных углеродных электродов / Е.В.Супрун, Р.Р.Габсабиров, Г.А.Евтюгин, Г.К.Будников // Всероссийская конф. "Актуальные проблемы аналитической химии". Москва, 11-15 марта 2002 г. М.- 2002.- Т.2.- С.168-169.
4. Евтюгин Г.А. Биохимическое тестирование промышленных сточных вод / Г.А.Евтюгин, Д.А.Семанов, Р.Р.Габсабиров // Вестник ТО РЭА.- 2002.- №3-4.- С.112-116.
5. Suprun E.V. Bi-enzyme amperometric sensors for the monitoring of environmental pollution / E.V.Suprun, R.R.Gabsabirova, G.A.Evtugyn, H.C.Budnikov // Euroanalysis-12. Dortmund, Sept. 8-13. 2002.- Book of Abstracts. P. 308.
6. Suprun E.V. Two-enzyme sensors based on screen-printed carbon electrodes covered with electropolymerised tyramine / E.V.Suprun, H.C.Budnikov,

R.R.Gabysabirova, G.A.Evtugyn // 17 International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Florence, Italy, June 19-24, 2003. P.199.

7. Габсабиров Р.Р. Ферментные сенсоры на основе модифицированных графитовых материалов / Р.Р.Габсабиров, Е.В.Супрун, С.В.Белякова, Е.Е.Стойкова // 3 Научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии 21 века". Казань, 5 мая 2003 г. С.45.